CRISPR-dCas9 调控基因转录的研究进展

田开仁[1,2,3]，薛二淑[1,2,3]，宋倩倩[1,2,3]，乔建军[1,2,3]，李艳妮[1,2,**]

（1 天津大学化工学院 天津 300072；2 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072；3 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072.）

摘要 CRISPR/Cas9 系统已不仅仅是一种革命性的基因编辑工具，还能在各种原核和真核生物中调控基因转录。近年来，由 CRISPR/Cas9 衍生而来的 CRISPR-dCas9 系统已被用于基因成像、高通量筛选、基因调控、必需基因功能研究及表观遗传调控等多个方向。本文总结了近年来 CRISPR-dCas9 系统在激活或抑制基因转录、降低脱靶效率、sgRNA 与转录强度及特异性之间的联系等方面的研究进展，以期对 CRISPR-dCas9 系统定向调控基因转录的研究提供参考和帮助，并就其未来可能的改进进行了展望。

关键词：CRISPR-dCas9；基因调控；转录激活；转录抑制

中图分类号：Q789

The Research Progress of CRISPR-dCas9 in Transcriptional Regulation

TIAN Kai-ren[1,2,3], XUE Er-shu[1,2,3], SONG Qian-qian[1,2,3] , QIAO Jian-jun [1,2,3], LI Yan-ni[1,2,**]

（1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Syn Bio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China.)

Abstract

The CRISPR/Cas9 system is not only a revolutionary tool for gene editing but also regulates gene transcription in various prokaryotic and eukaryotic organisms. In the recent years，the system of CRISPR-dCas9 derived from CRISPR/Cas9 has been used in many fields such as gene imaging, high-throughput screening, gene regulation, investigating essential gene function and epigenetic regulation. In this review, the recent advances of CRISPR-dCas9 for activating or inhibiting gene transcription, reducing off-targeting efficiency and combing the intrinsic relationship between sgRNA and transcriptional regulation, application in the life science and further upgrading were described.

Key Words: CRISPR-dCas9, transcriptional regulation, transcriptional activation, transcriptional inhibition

*国家自然科学基金资助项目（31570089）
**[**]通讯作者，电子邮箱：liyanni@tju.edu.cn

1 引言

CRISPR/Cas9 （ Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated 9, CRISPR/Cas9）系统是细菌和古细菌在长期进化过程中形成的一种适应性免疫防御系统，可以有效地切割降解进入细菌和古细菌细胞中外源 DNA[1-3]。近年来 CRISPR/Cas9 就如同暴风雨一样席卷了生物学的众多领域[4-6]，同时这一系统也在不断的被改造升级。现在的 CRISPR/Cas9 系统已不仅仅是一种革命性的基因组编辑工具，还是一种重要的基因调控工具。缺乏核酸酶活性但仍具有 RNA 引导下与 DNA 结合能力的 Cas9 蛋白（CRISPR-dCas9）已被广泛用在许多宿主中调节基因表达。该系统不会造成 DNA 双链断裂，可避免在特定基因上的永久突变对宿主的影响[7]。

CRISPR-dCas9 系统的作用机理是：a.人工设计合成的一小段特异性 RNA 序列（single guide RNA, sgRNA）与 dCas9 和转录调控因子形成的融合蛋白组成复合体；b.然后该复合体中的 sgRNA 的碱基互补配对序列与目标基因结合，c.最后是 dCas9-sgRNA 复合物作为一个支架将一系列效应分子募集到特定的位置来激活基因转录或因空间位阻阻止 RNA 聚合酶与启动子结合及抑制转录延伸，从而发挥调节功能（见图 1（a）和图 2（a））。目前，已有很多关于 CRISPR-dCAS9 在转录水平调控基因表达的研究报道。本综述对 CRISPR-dCas9 系统的研究进展进行了详细介绍并对其发展前景进行了展望。

2 CRISPR-dCas9 与基因转录激活（CRISPRa）

研究人员发现将 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 的两个保守的内切核酸酶结构域分别进行 RuvC 催化结构域的第 10 位天冬氨酸突变为丙氨酸（D10A）和 HNH 催化结构域的第 840 位组氨酸突变为丙氨酸 （H840A）后，Cas9 蛋白失去核酸内切酶活性（dead Cas9，dCas9），不能切割 DNA 但 dCas9 仍能与 sgRNA 形成复合物并与特定 DNA 序列结合[2, 8]。将转录激活因子或者 RNA 聚合酶ω亚基与 dCas9 融合表达，并利用 sgRNA 的特异性引导功能，该系统即可用于激活特定基因的表达（CRISPRa）。

1998 年，Simon 等[9]发现大肠杆菌 RNA 聚合酶的ω-亚基可提高 RNA 聚合酶

活性并激活转录，可大大提高基因转录水平。Bikard 等[10]在大肠杆菌中构建了ω亚基与 dCas9 的融合蛋白，研究该系统是否可激活报告基因转录。在该研究中，与对照组相比，融合表达蛋白使报告基因的转录水平提高了 2.8 倍，但这一系统在大肠杆菌中只是进行了初步验证。最近，Yu 等[11]在溶杆菌中鉴定并利用ω亚基与 dCas9 的融合蛋白显著激活了五个共表达的基因，这是 CRISPRa 系统在原核生物中的再次应用和验证。而在真核细胞中，VP64 激活域与 dCas9 的 C 末端融合蛋白不仅仅可以激活报告基因，还可以激活被沉默的内源基因或者上调可转录基因的转录量[8, 12]（见图 1 b）。Polstein 等[13]在此基础上通过将光诱导的异二聚化蛋白 CRY2 和 CIB1 分别同转录激活域 VP64 及 dCas9 融合进一步开发了一个在蓝光下可激活内源基因的系统，可以实现在时间和空间上精确控制细胞行为。与此同时，以上描述的这种拆分成两部分的 Cas9 系统被借鉴并形成了一个分子更小的 dCas9-VP64 系统[14]。这些系统都能在时间和空间动态激活基因转录。

研究显示：dCas9-VP64 系统利用单个 sgRNA 在哺乳动物细胞中的激活转录水平较低，而在启动子上游区域设计多个 sgRNA 可以增强该系统的激活能力[15, 16]。这些现象提示研究者们可以通过改进融合蛋白使其能募集多个转录激活因子或具有多个激活子结构域从而增强 CRISPRa 系统的激活能力。基于这一理念，多种二代 dCas9-激活子融合蛋白被开发出来，这些系统包括多拷贝数的 VP16、VPR(VP64-p65-Rta)及 SunTag（募集多个抗体-VP64 复合物）[17-19]（见图 1（c），（d）和（e））。Chavez 等[18]的研究表明这些不同构造的系统在多种哺乳动物细胞中能很好的激活基因。另外，转录激活因子可以通过一个 RNA 发夹环和 MS2 噬菌体外壳蛋白（与 RNA 发夹环具有极高的亲和力）吸附到 sgRNA 上[20]。Konermann 等[19]对 sgRNA 的骨架进行修饰设计并开发出了一种与 dCas9-VPR 类似的系统（Synergistic actvation mediator, SAM）。SAM 系统通过共表达 dCas9-VP64 融合蛋白、带发夹结构的 sgRNA 及一个 MS2-VP64 或 MS2-P65-HSF1 融合蛋白来实现 RNA 介导的靶向激活基因转录。SAM 系统不仅仅能显著激活编码基因的表达，而且对长链非编码 RNA（Long noncoding RNA, lncRNA）的表达也具有很好的调节作用。

dCas9 还可以与表观遗传修饰子融合来靶向修饰增强子区域的表观遗传标记，从而激活基因转录。在最近的一项研究中，将 dCas9 与转录激活因子乙酰转

移酶 p300（一种高度保守的乙酰转移酶，涉及广泛的细胞过程）的催化核心融合（dCas9-p300core）可以在人类细胞中激活基因转录（见图 1（f））。该融合蛋白在靶位点催化组蛋白 H3 赖氨酸 27 乙酰化，引起启动子和近端或远端增强子变化从而显著激活靶基因转录。dCas9-p300core 引起的基因激活在全基因组范围内具有高度的特异性[21]。

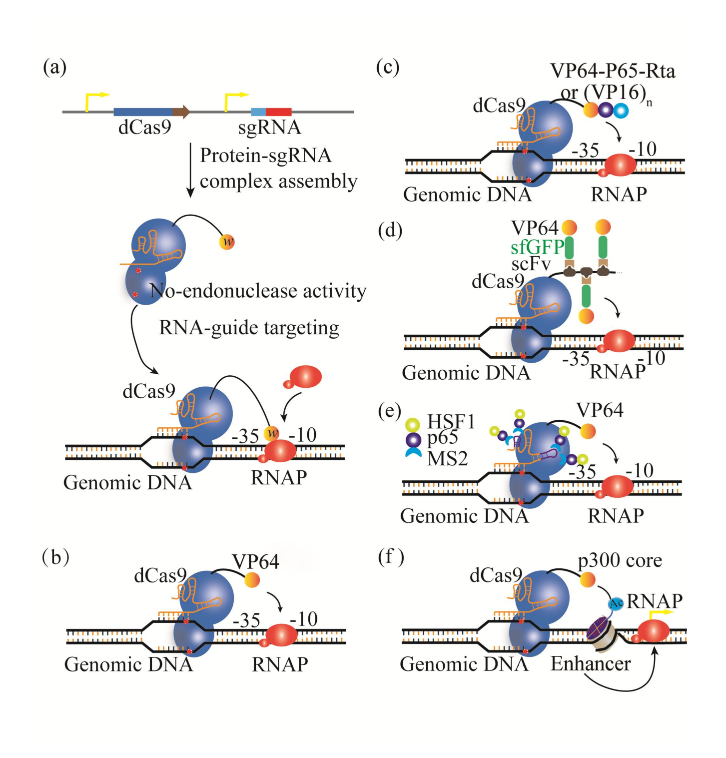


图 1 CRISPRa 系统的作用机理及不同类型的 CRISPRa 系统（a）CRISPRi 系统激活基因转录机理（b）dCas9-VP64 系统 （c）dCas9- VPR 或者$(VP16)_n$系统（d）dCas9-SunTag 系统 （e）SAM 系统（f）dCas9-p300core 系统

Fig.1 The mechanism of CRISPRa and different types of CRISPRa activation systems（a）the mechanism of CRISPRa activates gene transcription（b）The dCas9–VP64 system（c）The dCas9–VPR or $(VP16)_n$ system（d）The dCas9-SunTag system（e）The SAM system（f）The dCas9-p300core system

虽然这些二代 CRISPRa 系统已经证明可以通过体外 sgRNA 导向来进行有效功能遗传学研究，但是在体内使用它们仍然是一个不小挑战[22, 23]。这主要是因为 dCas9 融合蛋白体内转导和靶向激活效率低。另外，编码 dCas9/sgRNA 和共转录激活复合物的基因序列太大，远远超出了大多数常见病毒载体运载能力，然而这是目前来说最有前途的用于体内基因递送的方法[22, 23]。新的小型化的 Cas9 可能为今后的研究提供更多的帮助。而体内激活率的提高应寄希望于新的转录激活子

的获得或已有系统的进一步优化设计。

3 CRISPR-dCas9 与抑制基因转录（CRISPRi）

dCas9 不仅仅能用来激活特定基因转录，还可以用于转录抑制。由于 dCas9 干扰基因转录的能力，这一衍生的 CRISPR 系统被称为 CRISPRi。CRISPRi 通过 dCas9-sgRNA 复合物与目标 DNA 的靶向结合形成空间位阻，抑制目标 DNA 的转录，进而形成对目标基因的表达抑制[24]。CRISPRi 系统主要通过以下两种方式抑制目标基因转录：（1）阻止 RNA 聚合酶与目标基因的启动子结合抑制转录；（2）与开放阅读框靶向结合，抑制转录延伸（相当于转录终止子）（见图 2（a））。2013 年，Qi[25]等人在大肠杆菌首次证明了单独的 dCas9 就可以作为转录抑制子并实现序列特异性基因转录抑制，并证明这种 CRISPR 干扰（CRISPRi）系统是在基因组范围内选择性干扰基因表达的简单方法。与此同时，Bikard 等[10]使用 CRISPR-dCas9 系统通过阻止 RNA 聚合酶与启动子序列的结合或通过阻断 RNA 聚合酶的移动（相当于转录终止子）在大肠杆菌中实现可编程的转录抑制。dCas9 引起的转录抑制与 sgRNA 的位置有关，其抑制基因的转录量是可控的。与 dCas9 激活系统相比，dCas9 抑制系统的活性仅仅与 sgRNA 的靶向位置有关，理论上在不同的基因间、细胞和物种中均可发挥抑制作用。2015 年，Piatek 等[26]将 dCas9 的 C 端与 SRDX 的转录阻遏结构域融合并成功用于植物细胞中内源基因的转录抑制。不久之后，Choudhary 等[27]介绍了一种 CRISPR 干扰（CRISPRi）方法，可有效抑制分枝杆菌中靶基因的表达。Smith 等[28]系统地分析了各种 gRNA 设计，以便在酿酒酵母中实现有效的转录抑制，并提出有效的文库设计和全基因组可编程基因抑制目的的规则。目前，CRISPRi 系统已在多种模式生物中得到了验证[28-31]。然而，这种基因转录抑制的研究很少在缺乏已开发的基因组工程工具的非常规微生物中得到证实。尽管 dCas9 能够在真核生物中抑制基因转录，但是其抑制水平较低。为了提高转录抑制强度，研究人员[15, 32]将 dCas9 与不同转录抑制子融合表达并进行相关验证，最终发现 KRAB-dCas9 融合蛋白具有较高的抑制效率，sgRNA 设计合理时候其抑制效率可达 90~99%，但是需要筛选多个 sgRNA 才能获得 1~2 个有效的 sgRNA[33]（见图 2（b））。虽然 dCas9-KRAB 工具也是依赖于局部染色质修饰来沉默基因表达（募集染色质修饰复合物）[34]，但是通过直接去除增强子特定区域特定的活化表观遗传标记也可以使基因沉默。例如，组蛋

白去甲基化酶 LSD1 与小的同 Cas9 同源的 dNmCas9 融合后可直接去除激活的 H3K4 甲基化标记导致增强子失效而抑制的基因转录[35]（见图 2（c））。该工具通过增强子去活化发挥作用，提供了一种新的调控转录的表观遗传学方法。

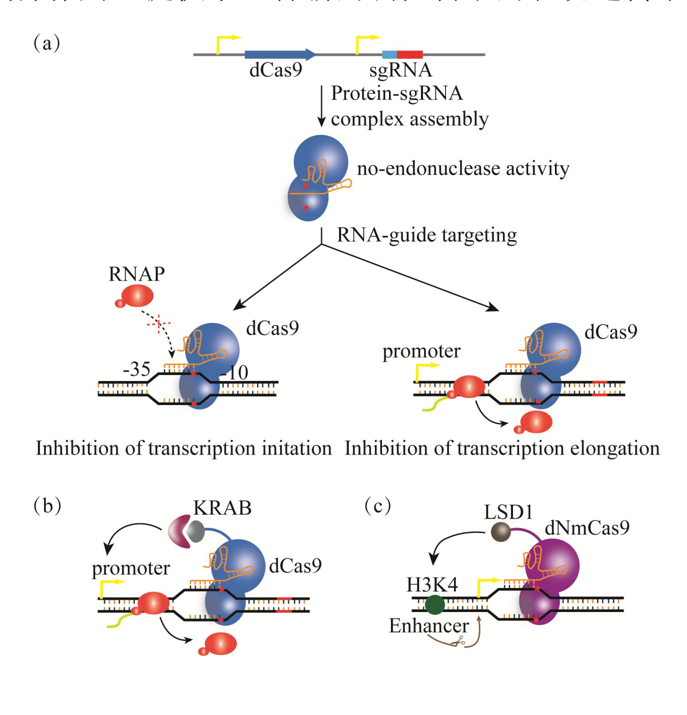


图 2 CRISPRi 系统作用机制及不同类型的 CRISPRi 抑制系统 (a) CRISPRi 系统抑制基因转录机理（b）dCas9-KRAB 系统（c）dCas9-LSD1 系统

Fig.2 The mechanism of CRISPRi and different types of CRISPRi inhibition systems（a）the mechanism of CRISPRi inhibits Gene Transcription（b）The dCas9–KRAB system（c）The dCas9-LSD1 system

4 CRISPR-dCas9 的特异性和 sgRNA 设计

关于 Cas9 的脱靶效应已有很多研究报道，但是仍然未能很好的解决这一问题[36, 37]。通常情况下，研究人员通常利用外源的绿色荧光蛋白作为靶标，设计特异性的 sgRNA 和阴性对照 sgRNA，用 RNA 测序技术检测 sgRNA 的特异性。对于 dCas9 系统，如 dCas9-VP64 和 SAM 系统也采用类似的技术证明系统的特异性。尽管研究表明这些系统具有良好的特异性，但是研究的 sgRNA 数量较少，说服力还不够[19]。对于 CRISPRi 系统，Gibert 等[33]研究了 1~5bp 的 sgRNA 碱基错配对 Cas9 和 dCas9-KRAB 特异性的影响，发现 dCas9-KRAB 系统对碱基错配更加敏感。这表明不同的效应子对 dCas9 特异性的影响可能不一样，对于每一个新的 dCas9 融合蛋白，都有必要研究其特异性。

一直以来，关于 sgRNA 设计的研究从未停止过，希望通过精心设计的 sgRNA

序列来增加RNA的靶向性并降低脱靶效率。有一些证据表明，精心设计的sgRNA可以降低脱靶率。虽然在CRISPR/Cas9系统用于基因编辑的时候其脱靶范围是全基因组[4, 8]，但是CRISPR-dCas9系统用于调节基因功能脱靶造成转录抑制或激活的概率要小很多[33, 38]。因为这些脱靶的sgRNA必须锚定到TSS上下1000bp的范围内才有可能导致靶基因转录抑制或者激活。CRISPR-dCas9系统sgRNA的设计不仅要考虑脱靶率，还要考虑碱基配对与DNA结合位点对调控作用的影响[39]。然而现在还没有一个成熟的准则和算法来评估sgRNA用于基因调控时的脱靶率，所以研究人员不得不采用Cas9的脱靶算法[39-42]。当然研究人员也给出一定的参考：例如Bikard等[10]表明，当PAM与TSS的距离在区域-50bp到+50bp之间时，单个的dCas9的抑制效应是最明显的。 而Qi等[7]说明，当靶向启动子区域和区域中的TFBS结合位点时，导向 RNA与正义链或反义链结合都具有良好的抑制效果，但在启动子区域的下游时只有与非模板链结合才有效。与此同时，2016年的一项研究系统地评估了人类细胞中sgRNA位置对CRISPRi效率的影响，分析了155个靶向41个基因的sgRNAs并发现CRISPRi效率很大程度上依赖于招募的效应复合物与靶基因转录起始位点（TSS）的结合位置[43]。专门针对CRISPRa系统的sgRNA设计指南相对来说更少。Liao等[44]的最新研究显示一个长度缩短为14bp的 sgRNA (dgRNA) 的CRISPR激活系统仍能靶向高效的激活特定基因的转录。从某种意义上来说，CRISPR-dCas9系统sgRNA的设计有其独特的特性。随着生物信息学的发展以及CRISPR-dCas9系统的不断开发和应用，研究人员最终必将解决这一问题。

5 CRISPRa 系统的应用和局限性

CRISPRa系统可以用于在多种生物过程中调节基因表达，包括干细胞分化、沉默基因激活、遗传缺陷补偿和全基因水平筛选。2016年，Black等[45]的最新成果表明使用具有dCas9的N端和C端融合VP64转录激活域的融合蛋白（VP64-dCas9-VP64）证明了直接通过激活特定内源性基因的细胞重编程可以将成纤维细胞诱导为神经元细胞。

一般来说，功能缺失型筛选可以通过RNAi或者CRISPR/Cas9系统来实现，而功能获得型筛选可以用过表达特定基因的方式来实现，但是这些方式都不能实现全基因组范围的基因调控。Konermannn等[19]基于强大的dCas9-SAM系统设计

并使用由 70,290 条引导 RNA 构成的文库在人类细胞全基因组范围内筛选针对 BRAF 抑制剂的抗性基因。这些筛选出来的基因与以前的发现高度一致，同时也发现了一些新的基因。总的来说，该技术用于抗性基因的筛选以及全基因组范围内的基因扰动是完全可行的。

CRISPR 相关系统从诞生以来就得到了广泛的关注，但是由于其潜在的脱靶性以及 DSB 切割修复过程中的造成的突变，大大限制了这一技术的临床应用。CRISPR-dCas9 这一衍生出来的系统保留了 sgRNA 介导直接靶向特定基因特性，但是不具有切割 DNA 的功能，这无疑会避免因为基因突变而给人体带来的未知伤害。尽管 CRISPRa 系统表现出了很好的医疗潜力，但是走向临床或者相关的研究报道还较少。一个潜在的医疗应用例子是将这一系统作为抗逆转录病毒的佐剂以治愈艾滋病[46, 47]。CRISPRa 系统被用来激活潜伏的 HIV 基因组上的基因，使其更易被抗逆转录病毒药物影响或者被免疫系统清除。当然，也可以利用这一系统快速筛选可以高效激活 HIV 基因的调控元件，并开发出新的方式用于治疗 HIV。而另一个例子对于重度烧伤病人来说将是一个福音，Sun 等[48]通过靶向 EDA 编码基因的启动子的 CRISPR-dCas9 激活系统有效诱导并重新编程人类骨髓来源的间充质干细胞，以促进其分化为汗腺样细胞。

现在 CRISPRa 系统的应用越来越广，并丰富了研究人员调节基因功能的手段[11]。Yu 等[11]利用 CRISPR-dCas9 与 ω 亚基的融合蛋白靶向激活溶杆菌的 WAP 基因簇的五个共表达的基因的转录与过表达自我保护基因结合的方法提高了对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌有强烈活性的抗生素-环脂缩肽 WAP-8294A 的产量。2018 年，Gallego-Bartolomé 等[49]开发了一种利用人脱甲基酶 TET1 催化结构域与修饰后的 CRISPR/dCas9-SunTag 共同组成的 CRISPR-dCas9 的靶向去甲基化系统，该系统可以在拟南芥中靶向除去甲基化状态，定向激活 *FWA* 基因。虽然 CRISPRa 技术较其他传统手段有其显著的优势，但是也有不少问题，例如脱靶效应、递送困难及潜在的免疫原性，其中还有一个值得特别关注的问题就是激活内源基因依赖 sgRNA 的选择以及激活效率较传统过表达低的多。当然在研究特定基因功能时，这可能不是一个大问题。但是如果涉及到多个因素时（例如成熟细胞的重编程），这无疑会成倍加大研究的难度。因此，如何进一步提高激活转录的强度及快速设计大量且特异性良好的 sgRNA 需要进一步研究和探索。

6 CRISPRi 系统的应用和局限性

CRISPRi（CRISPR Interference）系统是在 CRISPR/Cas9 的基础上衍生而来的，可以特异性的抑制基因的转录而并非将基因 knockout 来实现调控。同时，CRISPRi 系统能将靶基因的转录量控制在不同水平。必需基因功能的发挥决定了细胞的核心过程，但是必需基因功能的丧失会导致细胞无法生存，基因突变或者基因缺失都不能用来研究必需基因功能。2016 年，Qi 等[50]利用 CRISPRi 技术敲低了枯草杆菌的每个必须基因，并探究细菌相关表型。这一研究为在体内系统研究必需基因功能提供了一个广泛适应于各种微生物和比较分析的一个新的参考。而在 2017 年，Dong 等[51]为了更好的理解金黄色葡萄球菌的遗传机制，开发了一种新的 CRISPR-dCas9 干扰方法用于靶基因的快速敲减。此外，使用这种方法可以同时抑制多个基因转录。CRISPRi 系统在研究基因功能方面具有明显的优势。

长链非编码 RNA（lncRNA）是一种神秘的长 200 多个核苷酸但不会编码任何蛋白质的分子。虽然 lncRNA 大量存在，但是人们并不清楚有多少数量的 lncRNA 以及哪些 lncRNA 在基础生物学功能中发挥重要作用。高效快速的鉴定方法的开发对于研究这类重要的调控 RNA 具有重要的意义。Liu 等[52]利用 CRISPRi 技术在多个细胞系中关闭非编码转录本的转录，鉴定出了细胞生长所需的 499 个 lncRNA。因此，在发生细胞增殖的癌症等疾病中，这些鉴定出的位点可能用于开发一种基于 RNA 干扰的新的治疗方法。

CRISPRi 这一能特异性使基因转录抑制以及可调控转录水平的平台已经在各个领域得到了良好的应用，例如基于分析代谢途径利用 CRISPRi 调控必须基因转录水平来提高代谢物产量[53]或减少副产物的分泌[54]、全基因组范围内基因筛选[55]及敲低特定基因转录量以研究基因功能[40]等。尽管目前的转录抑制系统已经非常高效并且应用广泛，但是仍有改进的空间，例如高丰度表达时抑制可能不明显和 sgRNA 的筛选问题。

7 展望

随着科研人员的不断研究改进以及更多新的 CRISPR 系统的发现，基于 CRISPR 系统的基因干扰或基因激活系统必将进一步被改进和优化。目前，dCas9 与效应子融合表达的基因序列及融合蛋白的相对分子量较大，严重影响该系统在微生物中的开发和应用，同时也使体内应用时递送难度加大。以此来看，新的更

小的CRISPR系统的发掘具有重大意义。一个在非培养微生物中挖掘出来的CasX就具有开发出更小的调控基因转录系统的潜在可能性[56]。最近，Hu等[57]通过改进得到的xCas9具有更多的识别位点和更低的脱靶效率。虽然xCas9系统的应用潜力需要进一步验证，但是谁能确定这个蛋白不能用于构建脱靶效率更低的基因调控系统。

由于其高效性和简便性，CRISPR/Cas9及CRISPR-dCas9系统已经广泛应用于生物医学和生物技术领域。无论是基因组编辑还是靶标调控在不久的将来必将完美应用于临床。尽管由于一些限制和缺点，CRISPR系统并不像我们想象的那么完美（例如，引导RNA的具体作用机制及如何进一步降低或者消除脱靶超出了我们现在的知识范围），但是随着学习和探索的不断深入，我们面临的问题将会逐渐被解决。这些问题的解决可以帮助我们更好地利用CRISPR-dCas9系统去造福人类并将其用于临床，为干细胞分化、代谢工程、细胞重编程、基因功能研究和筛选以及工业微生物育种技术的发展奠定良好的基础。

总之，随着CRISPR-dCas9系统的出现，CRISPRa/CRISPRi系统增强了我们探究基因功能及调控基因转录的能力。我们认为CRISPR调控系统将会应用到越来越多的原核和真核生物中，并且将在人类疾病的研究中发挥更加重要的作用。

参考文献

[1] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(39): E2579-2586.

[2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity [J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.

[3] Westra E R, van Erp P B, Kunne T, et al. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3 [J]. Molecular Cell, 2012, 46(5): 595-605.

[4] Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 827-832.

[5] Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 227-229.

[6] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233-239.

[7] Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183.

[8] Mali P, Aach J, Stranges P B, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 833-838.
[9] Dove S L and Hochschild A. Conversion of the omiga subunit of Escherichia coli RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target [J]. Genes & Development, 1998, 12(5): 745-754.
[10] Bikard D, Jiang W, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(15): 7429-7437.
[11] Yu L, Su W, Fey P D, et al. Yield Improvement of the Anti-MRSA Antibiotics WAP-8294A by CRISPR/dCas9 Combined with Refactoring Self-Protection Genes in *Lysobacter* enzymogenes OH11 [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(1): 258-266.
[12] Maeder M L, Linder S J, Cascio V M, et al. CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 977-979.
[13] Polstein L R, Gersbach C A. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation [J]. Nature Chemical Biology, 2015, 11(3): 198-200.
[14] Zetsche B, Volz S E, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(2): 139-142.
[15] Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. Cell, 2013, 154(2): 442-451.
[16] Kearns N A, Genga R M J, Enuameh M S, et al. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells [J]. Development, 2014, 141(1): 219-223.
[17] Tanenbaum M E, Gilbert L A, Qi L S, et al. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging [J]. Cell, 2014, 159(3): 635-646.
[18] Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming [J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 326-328.
[19] Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. Nature, 2015, 517(7536): 583-588.
[20] Peabody D S. The RNA binding size of bacteriophage MS2 coat protein [J]. EMBO Journal, 1993, 12(2): 595-600.
[21] Hilton I B, D'Ippolito A M, Vockley C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 510-517.
[22] Thakore P I, Black J B, Hilton I B, et al. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation [J]. Nature Methods, 2016, 13(2): 127-137.
[23] Komor A C, Badran A H, Liu D R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes [J]. Cell, 2017, 168(1-2): 20-36.
[24] Dominguez A A, Lim W A, Qi L S. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015, 17(1): 5-15.
[25] Larson M H, Gilbert L A, Wang X, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression [J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2180-2196.
[26] Piatek A, Ali Z, Baazim H, et al. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors [J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(4): 578-589.

[27] Choudhary E, Thakur P, Pareek M, et al. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria [J]. Nature Communications, 2015, 6: 6267-6277.
[28] Smith J D, Suresh S, Schlecht U, et al. Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design [J]. Genome Biology, 2016, 17: 45-56.
[29] Singh A K, Carette X, Potluri L P, et al. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(18): e143.
[30] Wang Y, Zhang Z T, Seo S O, et al. Gene transcription repression in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR-dCas9 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(12): 2739-2743.
[31] Yao L, Cengic I, Anfelt J, et al. Multiple Gene Repression in Cyanobacteria Using CRISPRi [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(3): 207-212.
[32] Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states [J]. Nature, 2013, 500(7463): 472-476.
[33] Gilbert L A, Horlbeck M A, Adamson B, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation [J]. Cell, 2014, 159(3): 647-661.
[34] Thakore P I, D'Ippolito A M, Song L, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements [J]. Nature Methods, 2015, 12(12): 1143-1149.
[35] Kearns N A, Pham H, Tabak B, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion [J]. Nature Methods, 2015, 12(5): 401-403.
[36] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-1389.
[37] Huang H, Zheng G, Jiang W, et al. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in Streptomyces [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015, 47(4): 231-243.
[38] Polstein L R, Perez-Pinera P, Kocak D D, et al. Genome-wide specificity of DNA binding, gene regulation, and chromatin remodeling by TALE- and CRISPR/Cas9-based transcriptional activators [J]. Genome Research, 2015, 25(8): 1158-1169.
[39] Xu H, Xiao T, Chen C H, et al. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design [J]. Genome Research, 2015, 25(8): 1147-1157.
[40] Martinko A J, Truillet C, Julien O, et al. Targeting RAS-driven human cancer cells with antibodies to upregulated and essential cell-surface proteins [J]. eLife, 2018, 7: e31098.
[41] Doench J G, Hartenian E, Graham D B, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(12): 1262-1267.
[42] Wong N, Liu W, Wang X. WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system [J]. Genome Biology, 2015, 16 (1) : 218-225.
[43] Radzisheuskaya A, Shlyueva D, Müller I, et al. Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(18): e141.
[44] Liao H K, Hatanaka F, Araoka T, et al. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation [J]. Cell, 2017, 171(7): 1495-1507.
[45] Black J B, Adler A F, Wang H G, et al. Targeted Epigenetic Remodeling of Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells [J]. Cell Stem Cell, 2016, 19(3): 406-414.
[46] Zhang Y, Yin C, Zhang T, et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM)

induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16277-16290.
[47] Limsirichai P, Gaj T, Schaffer D V. CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression [J]. Molecular Therapy, 2016, 24(3): 499-507.
[48] Sun S, Xiao J, Huo J, et al. Targeting ectodysplasin promotor by CRISPR/dCas9-effector effectively induces the reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into sweat gland-like cells [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2018, 9(1): 8-17.
[49] Gallego-Bartolomé J, Gardiner J, Liu W, et al. Targeted DNA demethylation of the Arabidopsis genome using the human TET1 catalytic domain [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018, 115(9): E2125-E2134.
[50] Peters J M, Colavin A, Shi H, et al. A Comprehensive, CRISPR-based Functional Analysis of Essential Genes in Bacteria [J]. Cell, 2016, 165(6): 1493-506.
[51] Dong X, Jin Y, Ming D, et al. CRISPR/dCas9-mediated inhibition of gene expression in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Microbiological Methods. 2017, 139: 79-86.
[52] Liu S J, Horlbeck M A, Cho S W, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long non-coding RNA loci in human cells [J]. Science, 2017, 355(6320): aah7111.
[53] Lv L, Ren Y L, Chen J C, et al. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis [J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 160-168.
[54] Wang J, Zhao P, Li Y, et al. Engineering CRISPR interference system in *Klebsiella pneumoniae* for attenuating lactic acid synthesis [J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 56-67.
[55] Evers B, Jastrzebski K, Heijmans J P, et al. CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes [J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(6): 631-633.
[56] Burstein D, Harrington L B, Strutt S C, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes [J]. Nature, 2016, 542(7640): 237-241.
[57] Hu J H, Miller S M, Geurts M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [J]. Nature, 2018, 556(7699): 57-63.